

Method for detecting SARS virus and kit thereof

Patent number: CN1450172
Publication date: 2003-10-22
Inventor: WANG JIAN (CN); LI WEI (CN); WANG JUN (CN)
Applicant: HANGZHOU HUADA JENE RES CT (CN)
Classification:
- international: C12Q1/68; C12Q1/04; C12P19/34
- european:
Application number: CN20030116659 20030426
Priority number(s): CN20030116659 20030426

Abstract of CN1450172

The present invention discloses a method for clinical detection of SARS virus and its kit. According to the characteristic analysis of SARS virus genome sequence a specific region can be selected, and according to the characteristics of that said virus is of ribonucleic acid virus a specific primer sequence can be used and the reagent and techniques related to RT-PCR and PCR can be adopted so as to create a set of methods for quickly detecting SARS virus. Said invented method has higher accuracy, and provides its diagnosis method and its kit.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

C12Q 1/04 C12P 19/34



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03116659.8

[43] 公开日 2003 年 10 月 22 日

[11] 公开号 CN 1450172A

[22] 申请日 2003.4.26 [21] 申请号 03116659.8

[71] 申请人 杭州华大基因研发中心

地址 310007 浙江省杭州市西湖区西山路 13 号

[72] 发明人 汪建 王俊 李蔚 徐祖元
林伟 胡咏武 张晓伟 邓亚军
杨唤明

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 韩介梅

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 检测非典型性肺炎病毒的方法及其试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种临床检测非典型性肺炎病毒的方法及其试剂盒。根据非典型性肺炎病毒基因组序列的特征分析,选取特异性的区域,又根据该病毒是核糖核酸病毒的特点,利用特定的引物序列,采用 RT-PCR 和 PCR 相关的试剂与技术,建立了一套快速检测非典型性肺炎病毒的方法。本发明的有益效果是解决了临床对非典型性肺炎病毒感染者的早期快速诊断问题,具有较高的准确性,为临床检测本病提供了快速、准确的诊断方法和试剂盒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

1. 一种检测非典型性肺炎病毒的方法，它包括以下几个步骤：
 - 1) 取可疑病人的血清、分泌物或组织等生物学样本，提取 RNA。
 - 2) 加入反向引物和逆转录酶，合成 cDNA。
 - 3) 加入正向引物，利用聚合酶链式反应 (PCR) 技术扩增非典型性肺炎病毒的基因组核酸序列。
 - 4) 采用常规实验室检测 DNA 技术检测结果。
2. 按权利要求 1 所述的检测非典型性肺炎病毒方法，其特征在于所说的 PCR 反应扩增的非典型性肺炎病毒的基因组核酸序列具有序列 Seq. ID No.1、Seq. ID No.2、Seq. ID No.3、Seq. ID No.4、Seq. ID No.5、Seq. ID No.6 所示的核酸序列。
3. 按权利要求 1 所述的检测非典型性肺炎病毒方法，其特征在于加入的正、反向引物具有如表 1 的核酸序列，表中 L 为正向引物，R 为反向引物。
4. 按权利要求 1 所述的检测非典型性肺炎病毒方法的试剂盒，其特征在于它包括以下试剂：PBS 缓冲液、溶液 D (溶液 D 含：2.5 克异硫氰酸胍、1.76 毫升 0.75M 的柠檬酸钠 (PH7.0)、2.46 毫升 10% 的十二烷基肌酸钠，加水 29.3 毫升，使用前加入 7.2 μ l/ml 的巯基乙醇)、酚、氯仿和 4.0M (PH=3.8) 醋酸钠、RT 缓冲液 dNTP、引物和使用说明书。

检测非典型性肺炎病毒的方法及其试剂盒

技术领域

本发明涉及检测非典型性肺炎病毒的方法及其试剂盒。

背景技术

非典型性肺炎病毒，即 SARS 病毒是一种引起严重急性呼吸道疾病综合症 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS)，又称非典型性肺炎的病毒，属冠状病毒 (coronavirus) 类病毒，基因组共含 29,737 个核苷酸。该病主要通过近距离空气飞沫和密切接触传播。该病毒目前还没有有效的免疫化学检测方法，只能根据临床症状（高热、干咳、肺部 X 光检测有阴影等）来诊断，受到很大的局限，只能在受感染者发病后才能作出诊断，且不易与其它肺炎和一般流感区别。

发明内容

本发明的目的是提供一种检测非典型性肺炎病毒的方法及其试剂盒。

发明提供的检测非典型性肺炎病毒的方法，它包括以下几个步骤：

1) 取可疑病人的血清、分泌物或组织等生物学样本，提取 RNA；

提取 RNA 的方法可采用普通分子生物学实验手册，如“分子克隆”介绍的方法，也可以采用商业试剂盒，如 Trizol[®]，按说明书进行。

2) 加入反向引物和逆转录酶，合成 cDNA；

加入的反向引物为根据非典型性肺炎病毒特异核酸序列和 PCR 反应要求所设计，“非典型性肺炎病毒特异核酸序列”具有 Seq. ID No.1、Seq. ID No.2、Seq. ID No.3、Seq. ID No.4、Seq. ID No.5、Seq. ID No.6 所示的核酸序列；

发明中采用的引物序列，为表 1 所示的核酸序列，表 1 中 R 为反向引物；采用商品化试剂盒，如 Invitrogen[™] 公司的 SuperScript 试剂盒，按说明书步骤合成 cDNA。

3) 加入正向引物，利用聚合酶链式反应 (PCR) 技术扩增非典型性肺炎病毒的基因组核酸序列；

加入的正向引物为根据非典型性肺炎病毒特异核酸序列和 PCR 反应要求所设计，“非典型性肺炎病毒特异核酸序列”为具有 Seq. ID No.1、Seq. ID No.2、Seq. ID No.3、Seq. ID No.4、Seq. ID No.5、Seq. ID No.6 所示的核酸序列；

发明中采用的引物序列，为表 1 所示的核酸序列，表 1 中 L 为正向引物；

本发明中, PCR 反应体系的组成为一般的标准组成, 包括: PCR 反应缓冲液 (Tris.Cl 125mM PH 8.1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 125mM; MgCl_2 12.5mM; BSA 1mg/ml; Formamide 25%); 反应条件指: 模板变性温度为 92°C - 98°C , 优选: 95°C , 时间为 10 秒-10 分钟, 优选: 30 秒; 模板退火温度为 45°C - 65°C , 优选: 52°C , 时间为 10 秒-10 分钟, 优选: 30 秒; 模板延伸温度为 65°C - 85°C , 优选: 70°C , 时间为 10 秒-10 分钟, 优选: 40 秒; 循环 20-40 次, 优选: 30 次。

4) 采用常规实验室检测 DNA 技术检测结果:

常规实验室检测 DNA 技术检测, 如采用 1% 琼脂糖电泳检测: 用溴乙锭染色, 在紫外光下观察, 有条带的为阳性, 无条带的为阴性; 也可采用荧光 PCR 法检测以提高检测灵敏度, 其方法均可在常规实验室手册查到。

本发明的用于检测非典型性肺炎病毒的试剂盒, 它包括以下试剂: PBS 缓冲液、溶液 D (溶液 D 含: 2.5 克异硫氰酸胍、1.76 毫升 0.75M 的柠檬酸钠 (PH7.0)、2.46 毫升 10% 的十二烷基肌酸钠, 加水 29.3 毫升, 使用前加入 $7.2\mu\text{l/ml}$ 的巯基乙醇)、酚、氯仿和 4.0M (PH=3.8) 醋酸钠、RT 缓冲液 dNTP、引物和使用说明书。

本发明根据非典型性肺炎病毒的基因组序列分析结果, 选取该病毒特有的核酸序列区, 设计引物, 并针对该病毒是一种核糖核酸病毒 (RNA 病毒) 的特点, 为临床检测非典型性肺炎病毒提供了快速、准确的诊断方法和试剂盒。采用该方法能快速地对可疑感染者进行基因检测, 解决了临床对非典型性肺炎病毒感染者的早期快速诊断问题。

附图说明

图 1 是琼脂糖电泳检测的结果, 从左至右 1-5 为阳性结果, 7-8 为阴性对照, 10 为分子量标记。

具体实施方式

实施例

1、取可疑病人的生物学样本, 提取 RNA:

1) 取可疑病人的血清、分泌物或组织, 加入 PBS 缓冲液 $50\mu\text{l}$ 、溶液 D $160\mu\text{l}$ 、酚 $160\mu\text{l}$ 、氯仿 $32\mu\text{l}$ 和 4.0M (PH=3.8) 醋酸钠 $9\mu\text{l}$ 。

溶液 D 含: 2.5 克异硫氰酸胍、1.76 毫升 0.75M 的柠檬酸钠 (PH7.0)、2.46 毫升 10% 的十二烷基肌酸钠, 加水 29.3 毫升, 使用前加入 $7.2\mu\text{l/ml}$ 的巯基乙醇。

2) 振荡混合液 15 秒, 冰上放置 15 分钟。

3) 14000rpm , 4°C 离心 20 分钟。

4) 取上清, 加入等体积的异丙醇, 冰上放置 25 分钟。

5) 4°C, 14000rpm 离心 20-30 分钟。

6) 沉淀用 -20°C 预冷的乙醇洗两次, 真空抽干, 溶于 DEPC 水中。

2、加入反向引物和逆转录酶, 合成 cDNA:

采用 Invitrogen™ 公司的 SuperScript 试剂盒

1) 适量样品 RNA、加入表 1 中所列的反向引物 (0.5ug/ml) 2.5 μl, 95 °C 保温 3-4 分钟, 冰上冷却。

2) 加入 5×RT 缓冲液 4.0 μl、dNTP¹(10mM) 1.0 μl、0.1M DTT 2.0 μl、Superscript(200u/μl) 1.0 μl、Rnasein(25u) 1.0 μl, 40°C 保温 1 小时, 70°C 保温 5 分钟, 冰上冷却。

3、加入正向引物, 利用聚合酶链式反应 (PCR) 技术扩增非典型性肺炎病毒的基因组核酸序列:

取步骤 2 合成的 cDNA 模板 1.0 μl、加入表 1 中所列的正向引物 1.0 μl、10×PCR 反应缓冲液 2.5 μl、Mg²⁺(25mM) 1.75 μl、dNTP(2.5mM) 0.8 μl、Taq(5u/μl) 0.25 μl, 加水至 25 μl; 95°C 保温 5 分钟。95°C, 30 秒; 54°C, 45 秒; 72, 1 分钟, 循环 30 次, 72°C 保温 7 分钟。

4、结果检测

1%琼脂糖电泳检测, 用溴乙锭染色, 紫外光下观察, 有条带的为阳性, 无条带的为阴性。

表 1 用于检测的引物序列

引物名称	引物序列	基因组位置
p00001.1.L	ACGAAC TTTAAAATCTGTGTAGC	51
p00001.59.L	ATGCC TTAAGCACCAATCAC	472
p00001.1.R	ATTTCTGCAAC CAGCTCAAC	504
p00001.70.L	CAAGTCAATGTGCACTCTTTC	875
p00001.59.R	CTCTTCGACTCGATGTAATCA	905
p00001.7.L	TGTGGCACTGAAAATTTAGTTA	1278
p00001.70.R	TAGGTACCCACATGTAGTAGGTC	1306
p00001.18.L	GGCATCTTTCTCTGCTTCTAC	1679
p00001.7.R	GGTTTTGAAAGACTTGTAATCAA	1729
p00001.29.L	CTCAGTGGTTGTCTAATCTTTTG	2077
p00001.18.R	CTGAGTTTTTCAACAGTAGTGC	2101
p00001.40.L	AGGTGATTCACATGACACAGTA	2477
p00001.29.R	GAACAACCTCCTCAGAGGTAA	2500
p00001.51.L	AGAGGCTGTTGTGAAGACTTT	2879

p00001.40.R	AGGAGATCAGAACTGGTTGT	2900
p00001.57.L	TGGTTATTTAAACTTACTGACAAT	3269
p00001.51.R	CCTTAACGATGTCAACACATTT	3303
p00001.58.L	AACCACTTCAGTCTTTACAAGTG	3652
p00001.57.R	GCTTTGTCATTGACTGCAATA	3704
p00001.60.L	TGTTGTAATACCCTCCAAAAAG	4070
p00001.58.R	TCTTGAGAGCATCTCAGTAGT	4101
p00001.61.L	TTATTACGAAGCTGAACTCTCTA	4477
p00001.60.R	ATTGTGACAAGCGGCTCATT	4500
p00001.62.L	GACTATAAAAGTGTTCACAACCTG	4877
p00001.61.R	GTGTGTGGAGATTAGTGTGTGTC	4902
p00001.63.L	TATTATAGAGCCCGTGCTGGT	5274
p00001.62.R	AGTATGAGTGCACAAAAGTTAGC	5301
p00001.64.L	TCAGTGTGGTCATTACACTCATA	5672
p00001.63.R	AATACGATAGAGGGTCTCCTTAG	5701
p00001.65.L	GCGATGTAGTGGCTATTGAC	6073
p00001.64.R	TTCTTGAAACTCGCTGAATAGT	6100
p00001.66.L	GGAAAACACAAGCATTACCAT	6479
p00001.65.R	CCTAAGGCTAGTGAAAGCTCAT	6511
p00001.67.L	TGGCTATTGTTGTTAAGTATTTG	6873
p00001.66.R	GCAGTTACACAGATTAGAGAACC	6900
p00001.68.L	GCTCATGTGGTTTATCATTAGTA	7268
p00001.67.R	TACATCCTAACCATTGCAGAA	7310
p00001.69.L	CGCTTCACCTCTACTTTGAC	7678
p00001.68.R	CTCTCATAGGTCTTTTGACCAG	7702
p00001.71.L	TCCTTTCTACATTTCGTGTCAG	8065
p00001.69.R	GTCAACATCGGTATCAACAAC	8100
p00001.72.L	TGTTAGTACTTGTTTTAACTTATGC	8474
p00001.71.R	CGCACATAATGTGGCCTTA	8501
p00001.73.L	CTACACACCTTCCAAACTCATT	8867
p00001.72.R	AAGAACGCAAGCAGAGGTAG	8905
p00001.74.L	TACTCCTCTTGTC AACCTG	9272
p00001.73.R	CACTACTGAAGCAGACACATCTA	9301
p00001.75.L	CATGTTTAATGGAGTTACATTTAGT	9674
p00001.74.R	TTGTTGAGCAAAAAGGTACAC	9719
p00001.2.L	TGTGGTTGGATGACACAGTAT	10057
p00001.75.R	TAAGCATGTCTTCTGCTGTG	10100
p00001.3.L	GAGTACACGCTGGTACTGACTTA	10477
p00001.2.R	AAATGGACCATAGAATTTACCTT	10501
p00001.4.L	ACCTTCCAAGGTAAGTTCAAG	10878
p00001.3.R	GATGAGTGCCCTTAACAATT	10900
p00001.5.L	GTTTATGATGATGCTGCTAGAC	11277
p00001.4.R	GACATTCATCAGTGTC AAAAC	11301

p00001.6.L	CCTAAGAGTAGTATTGATGCTTTC	11670
p00001.5.R	CTCCAATACCCAACAACCTTAAT	11703
p00001.8.L	GCTGTAGCTAATGGTGATTCTG	12078
p00001.6.R	CTTTAACTTTTTGAGAACGACTT	12100
p00001.9.L	CAAGTTGTTGATGCGGATAG	12477
p00001.8.R	TTAATTTCACTAAGTTGAACAATC	12500
p00001.10.L	CAAAGGCTTAAACAACCTAAATA	12872
p00001.9.R	CCTGAAGACGTA CTGTAGCA	12920
p00001.11.L	CACTTAGAAACACAGTCTGTACC	13270
p00001.10.R	AGCCATAACCTTTCCACATT	13301
p00001.12.L	GTGACATGGTACCACATATATCA	13677
p00001.11.R	CAGCCATTGTGTATTTAGTTAGA	13708
p00001.13.L	GCCCATCCTCACTTTGACTA	14080
p00001.12.R	AGCATCCATATGGGACTCAG	14112
p00001.14.L	TATGCTGCTGATCCAGCTAT	14474
p00001.13.R	TAGCAATAAATTGCCAGAAG	14502
p00001.15.L	TAATAAATGGGGTAAGGCTAGA	14872
p00001.14.R	ATCTTGATCCTCATAACTCATTG	14907
p00001.16.L	CAAACATAACACTTGCTGTAACCTT	15274
p00001.15.R	CTAACCTGTAGAAACGGTGTG	15300
p00001.17.L	GTTTAGTAGCTAGCATTAGAAGT	15675
p00001.16.R	CAGACATGAACACATTATTTTGA	15718
p00001.19.L	TGCTAACTAATGATAACACCTCAC	16071
p00001.17.R	ATAGCCTCATAAACTCAGGTTC	16103
p00001.20.L	ATAGCAACATGTGATTGGACTAA	16475
p00001.19.R	ACAAGTGTTGGCAAGTATGTAAT	16506
p00001.21.L	CAAGAGCACTATGTGAGAATTAC	16877
p00001.20.R	ATGTTGAGTGTTGGGTACAAG	16903
p00001.22.L	TTGATGAAATCTCTATGGCTACT	17268
p00001.21.R	GTCTAGCATTGACAACACTCAA	17300
p00001.23.L	AAAAGCTGTTTTATCTCACCTT	17671
p00001.22.R	TGAAGCTACAGCGTTCTGTG	17700
p00001.24.L	ACATACCAGGCATACCAAAG	18075
p00001.23.R	CATAGAGATGAGTCTACGGTAGGT	18101
p00001.25.L	GGATTGTCAGACAGAGTCGT	18479
p00001.24.R	TCTTGACAAAGTACTTCATTGAT	18532
p00001.26.L	CTTGCAAAAAGTACAACACAT	18876
p00001.25.R	AAGCAATGCAGACTTCACAA	18900
p00001.27.L	TTGCCTTTCTTTTACTATTCTGA	19277
p00001.26.R	CCATGAGACTCACAAGGACTA	19300
p00001.28.L	ACTTCCTGTTAATGTTGCATT	19678
p00001.27.R	CACTGGTTTAATGTTACGCTTAG	19710
p00001.30.L	GTAGACGGCATTATTCAACAGT	20078

p00001.28.R	GCTCTGAGTAAAGTAGGTTTCAG	20103
p00001.31.L	CAAAAGTGGTCAAGGTTACAAT	20478
p00001.30.R	CACCAAAGCATGAATGAAAT	20513
p00001.32.L	TCAGATCTTAATGACTTCGTCTC	20864
p00001.31.R	TGCACAGTCTCCAATTAAAGT	20900
p00001.33.L	ATCCTATCCAGTTGTCTTCCTAT	21276
p00001.32.R	ATTTGCTCATGTCAAAGAGTG	21300
p00001.34.L	TTCTAATGTTACAGGGTTTCATA	21664
p00001.33.R	CATCCTTAAAAGGTATGACAGG	21710
p00001.35.L	GGCTATCAACCTATAGATGTAGTTC	22070
p00001.34.R	CAAAGTGTTAAAACCAGAAGGTA	22101
p00001.36.L	ACTAAATTCCTTCTGTCTATGC	22469
p00001.35.R	TAATCAGCAACACAATTAGAAAT	22508
p00001.37.L	CCCACCTGCTCTTAATTGTTA	22879
p00001.36.R	TGGTGTA AAAACCATAATCATTTA	22908
p00001.38.L	TTAACTGCACTGATGTTTCTACA	23277
p00001.37.R	GAGTTGATCTGCATGAATTG	23301
p00001.39.L	CTTCTCCAATATGGTAGCTTTT	23678
p00001.38.R	GAGTGACGATTTAGTTGTGT	23702
p00001.41.L	CTGGATGGACATTTGGTGCT	24072
p00001.39.R	GCATAGCAAAAGGTATTTGAAG	24101
p00001.42.L	ATCAGGGCTTCTGCTAATCT	24473
p00001.41.R	CAAGAACACACTCAGACATTTTA	24502
p00001.43.L	TGGACAAGTACTTCAAAAATCAT	24876
p00001.42.R	GTCGCCAAGATCAACATCTG	24906
p00001.44.L	TTTACTCTTGGATCAATTACTGC	25273
p00001.43.R	AGAAGCATTGTC AATTTTACTG	25301
p00001.45.L	TTATGATGCCAACTACTTTGTTT	25671
p00001.44.R	TGGTATACAGTAGTCATAGTTATGTG	25703
p00001.46.L	AGCACAAGAAAGTGAGTACGA	26076
p00001.45.R	TCCGAAACGAATGAGTACATA	26100
p00001.47.L	ATGTTACTACAATTTGCCTATTC	26475
p00001.46.R	TATTATGTACAAAACCTGTTCC	26503
p00001.48.L	AAGAGATCACTGTGGCTACATC	26875
p00001.47.R	ACGCTCCTAATTTGTAATAAGA	26907
p00001.49.L	TCTCTTCTGACATTGATTGTAT	27268
p00001.48.R	CTTAACACACTCCTGATAGTGA	27310
p00001.50.L	TTTCTGCTATTCCTTGTTTAAAT	27667
p00001.49.R	ATTTGAGTGAAAACCAAAATA	27701
p00001.52.L	GTTGTTTTAAATAAACGAACAAA	28076
p00001.50.R	GGGTCCATTATCAGACATTTTA	28100
p00001.53.L	GCTAACAAAGAAGGCATCTTA	28479
p00001.52.R	GTATTCAAGGCTCCCTCAGT	28509

p00001.54.L	AGCCTCGCCAAAAACGTACT	28876
p00001.53.R	TTGAGTGACGTTGTACTGTTTT	28901
p00001.55.L	AAAGGACAAAAAGAAAAAGACTG	29213
p00001.56.L	AAAGGACAAAAAGAAAAAGACTG	29213
p00001.54.R	CTGGAGAAATCATCCATGTC	29301
p00001.55.R	AATTTTACACATTAGGGCTCTTC	29636
p00001.56.R	AATTTTACACATTAGGGCTCTTC	29636

核酸序列表:

<110>杭州华大基因研发中心*

<120>非典型性肺炎病毒的基因检测法及试剂盒

<160>6

<170>PatentIn Version 3.1

<210>1

<211>1953

<212>DNA

<213>coronavirus SARS

<400>1

```

ctacccagga aaagccaacc aacctcgatc tctttagat ctgttctcta aacgaacttt      60
aaaatctgtg tagctgtgcg tcggctgcat gcctagtgc cctacgcagt ataaacaata      120
ataaatttta ctgtcgttga caagaaacga gtaactcgtc cctcttctgc agactgctta      180
cggtttcgtc cgtgttgacg tcgatcatca gcatacctag gtttcgtccg ggtgtgaccg      240
aaaggtaaga tggagagcct tgttcttggg gtcaacgaga aaacacacgt ccaactcagt      300
tlgcttgcgc ttcagggttag agacgtgcta gtgcglggct tcggggactc tgtggaagag      360
gccctatcgg aggcacgtga acacctcaaa aatggcactt gtggtctagt agagctggaa      420
aaaggcgtag tgccccagct tgaacagccc tatgtgttca ttaaagcttc tgatgcctta      480
agcaccaatc acggccacaa ggtcgttgag ctggttgacg aaatggacgg cattcagtac      540
ggtcgtagcg gtataacact gggagtactc gtgccacatg tgggcgaaac cccaattgca      600
taccgcaatg ttcttcttcg taagaacggt aataagggag ccggtgggta tagctatggc      660
atcgatctaa agtcttatga cttaggtgac gagcttggca ctgatcccat tgaagattat      720
gaacaaaact ggaacactaa gcaaggcagt ggtgcactcc gtgaactcac tcgtgagctc      780
aatggagggtg cagtcaactc ctatgtcgac aacaatttct gtggcccaga tgggtaccct      840
cttgattgca tcaaagattt tctcgacgc gcgggcaagt caatgtgcac tctttccgaa      900
caacttgatt acatcgagtc gaagagaggt gtctactgct gccgtgacca tgagcatgaa      960
attgcctggg tcaactgagc ctcgtgataa agctacgagc accagacacc cttcgaaatt     1020
aagagtgcc aaaaatttga cactttcaaa ggggaatgcc caaagtttgt gtttctctt     1080
aactcaaaag tcaaagtcac tcaaccacgt gttgaaaaga aaaagactga gggtttcatt     1140
gggcgtatcc gctctgtgta cctgttgca tctccacagg agtgnacaa tatgcacttg     1200
tctaccttga tgaatgtaa tcaatgcgat gaagtctcat ggcagacgtg cgactttctg     1260
aaagccactt gtgaacattg tggcactgaa aatttagtta ttgaaggacc tactacatgt     1320
gggtacctac ctactaatgc tgtagtgaat atgccatgct ctgctgtgca agaccagag     1380
attggaccig agcatagltg tgcagattat cacaaccact caaacattga aactcgactc     1440
cgcaaggagg gtaggactag atgttttggg ggtgtgtgt ttgcctatgt tggctgctat     1500

```

```

aataagcgtg cctactgggt tcctcgtgct agtgcgtgata ttggctcagg ccatactggc 1560
attactgggtg acaatgtgga gaccttgaat gaggatctcc ttgagatact gagtcgtgaa 1620
cgtgttaaca ttaacattgt tggcgatttt catttgaatg aagaggttgc catcattttg 1680
gcatctttct ctgcttctac aagtgccttt attgacacta taaagagtct tgattacaag 1740
tctttcaaaa ccattgttga gtcctgcggt aactataaag ttaccaaggg aaagcccgtg 1800
aaaggtgctt ggaacattgg acaacagaga tcagttttaa caccactgtg tggttttccc 1860
tcacaggctg ctggtgttat cagatcaatt tttgcgcgca cacttgatgc agcaaaccac 1920
tcaattcctg atttgcaaa agcagctgtc acc 1953

```

<210>2

<211>249

<212>DNA

<213>coronavirus SARS

<400>2

```

gatgaggaag aagaggacga tgcagagtgt gaggaagaag aaattgatga aacctgtgaa 60
catgagtacg gtacagagga tgattatcaa ggtctccctc tggattttgg tgcctcagct 120
gaaacagttc gagttgagga agaagaagag gaagactggc tggatgatac tactgagcaa 180
tcagagattg agccagaacc agaacctaca cctgaagaac cagttaatca gtttactggt 240
tatttaaaa 249

```

<210>3

<211>732

<212>DNA

<213>coronavirus SARS

<400>3

```

ccagttgatg agtatataac cacgtaccct ggacaaggat gtgctgggta tacacttgag 60
gaagctaaga ctgctcttaa gaaatgcaaa tctgcatttt atgtactacc ttcagaagca 120
cctaagtcta aggaagagat tctaggaact gtatccttga atttgagaga aatgcttgct 180
catgctgaag agacaagaaa attaatgcct atatgcatgg atgttagagc cataatggca 240
accatccaac gtaagtataa aggaattaaa attcaagagg gcatcgttga ctatgggtgc 300
cgattcttct ttatatactag taaagagcct gtagcttcta ttattacgaa gctgaactct 360
ctaaalgagc cgcttgtcac aatgccaat gggttatgta cacatgggtt taatcttgaa 420
gaggtcgcgc gcgtgatgcg ttctctttaa gctcctgccg tagtgtcagt atcatcacca 480
galgctggtt ctacatataa tggataccct acttcgtcat caaagacatc tgaggagcac 540
tttgtagaaa cagtttcttt ggctggctct tacagagatt ggtccclattc aggacagcgt 600
acagagttag gttgtgaatt tcttaagcgt ggtgacaaaa ttgtgtacca cactctggag 660
agccccgtcg agtttcatct tgacggtgag gttctttcac ttgacaaact aaagagtctc 720
ttatccctgc gg 732

```

<210>4

<211>1177

<212>DNA

<213>coronavirus SARS

<400>4

```

gggtgtcaaat tacattacac ataaacgaac ttatggattt gtttatgaga tttttactc 60
ttggatcaat tactgcacag ccagtaaaaa ttgacaatgc ttctcctgca agtactgttc 120
atgctacagc aacgataccg ctacaagcct cactcccttt cggatggcct gttattggcg 180
ttgcatttct tgctgttttt cagagcgcta ccaaaataat tgcgctcaat aaaagatggc 240
agctagccct ttataagggc ttccagttca tttgcaattt actgctgcta tttgttacca 300
tctattcaca tcttttgctt gtcgctgcag gtatggaggc gcaatttttg tacctctatg 360
ccttgatata ttttctacaa tgcacacacg catgtagaat tattatgaga tgttggcctt 420
gttggaaagt caaatccaag aaccattac tttatgatgc caactacttt gtttgcctggc 480
acacacataa ctatgactac tgtataccat ataacagtgt cacagataca attgtcgtta 540
ctgaagggtga cggcatttca acacaaaac tcaaagaaga ctaccaaat ggtggttatt 600
ctgaggatag gactcaggt gttaaagact atgtcgttgt acatggctat ttcaccgaag 660
tttactacca gcttgagtct acacaaatta ctacagacac tggattigaa aatgctacat 720
tcttcattct taacaagctt gttaaagacc caccgaatgt gcaatacac acaatcgacg 780
gctcttcagg agttgctaatt ccagcaatgg atccaattta tgatgagccg acgacgacta 840
ctagcgtgcc ttgttaagca caagaaagtg agtacgaact tatgtactca ttcgtttcgg 900
aagaaacagg tacgttaata gttaatagcg tacttctttt tcttgctttc gtggtattct 960
tgctagtac actagccatc cttactgcgc ttgattgtg tgcgtactgc tgcaatatg 1020
ttaacglgag tttagtataa ccaacgggtt acgtctactc gcgtgttaaa aatctgaact 1080
cttctgaagg agttcctgat cttctggctt aaacgaacta actattatta ttattctgtt 1140
tggaacttta acattgctta tcatggcaga caacgggt 1177

```

<210>5

<211>1059

<212>DNA

<213>coronavirus SARS

<400>5

```

cagtaagtga caacagatgt ttcattctgt tgacttcag gttacaatag cagagatatt 60
gattatcatt atgaggactt tcaggattgc tatttggaaat ctgacgtta taataagttc 120
aatagtga caattattta agcctctaac taagaagaat tattcggagt tagatgatga 180
agaacctatg gagttagatt atccataaaa cgaacatgaa aattattctc ttccctgacat 240
lgattgtatt tacatcttgc gagctatata actatcagga gtgtgtttaga ggtacgactg 300
lactactaaa agaaccttgc ccatcaggaa catacagagg caattcacca tttcacctc 360
ttgctgacaa taaatttgca ctaacttgca ctagcacaca ctttgclttt gcttgtgctg 420
acggtactcg acatacctat cagctgcgtg caagatcagt ttcacaaaaa cttttcatca 480
gacaagagga ggttcaacaa gagctctact cgccactttt tctcattgtt gctgctctag 540
tatttttaat actttgcttc accatttaaga gaaagacaga atgaatlgagc tcactttaat 600
lgacttctat ttgtgclttt tagcctttct gctattcctt gtttataataa tgcattat 660
atlllggtll tcactcgaan tccaggatct agaagaacct lgtaccaaag tctaaacgaa 720
catgaaactt ctcatgtttt tgacttgtat ttctctatgc agttgcataat gcaactgtat 780
acagcgctgt gcatctaata aacctcalgt gcttgaagat ccttgtaagg tacaacacta 840
gggttaatac ttatagcaat gcttggcttt gtgclctagg aaaggtttta ccttttanta 900
gatggcacac taiggttcaa acatgcacac ctaatgttac tatcaactgt caagatccag 960
ctgggtgtgc gcttataact aggtgttggg accttcatga aggtcaccaa actgctgcat 1020
ttagagacgt acttgggtt ttaaataaac gaacaaatt 1059

```

<210>6

<211>255

<212>DNA

<213>coronavirus SARS

<400>6

agacaacttc	aaaattccat	gagtggagct	tctgctgatt	caactcaggc	ataaacactc	60
atgatgacca	cacaaggcag	atgggctatg	taaacgtttt	cgcaattccg	tttacgatac	120
atagtctact	cttgtgcaga	atgaattctc	gtaactaaac	agcacaagta	ggtttagtta	180
actttaatct	cacatagcaa	tcittaatca	atgtgtaaca	ttaggaggga	cttgaaagag	240
ccaccacatt	ttcat					255

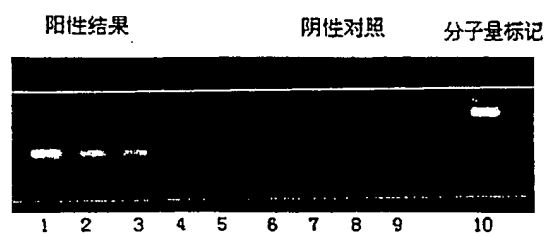


图 1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.